

# 結核血球凝集反応に関する研究

## 第 1 報

### 感作原に関する研究

#### 第 2 篇 人型結核菌 “H<sub>2</sub>” 菌体各分劃及び菌体加熱浸出液 をもつて処理せる血球の被凝集性に就て

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任：柿下正道教授)

中 島 滋

(受付：昭和29年10月1日)

本論文の要旨は第6回日本細菌学会北陸地方会に於て発表した。

**Sigeru NAKASHIMA : STUDIES ON HEMAGGLUTINATION IN TUBERCULOSIS**

Part 1. Studies on Principal Substances Capable of Sensitizing Erythrocytes

No. 2. On the Agglutination of Erythrocytes Treated with Constituents of

*Myc. tb.* Humanus “H<sub>2</sub>” by Serum from Tuberculosis Patient

*Department of Bacteriology and Immunology, Research Institute of  
Tuberculosis, Kanazawa University.*

(Director : Prof. Masamichi KAKISHITA)

(Received for publication : Oct. 1, 1954)

## 緒 言

Midllbrook, Dubos<sup>1, 2)</sup>は結核菌体よりフェノール抽出法により得た多糖体が血球に吸着され、感作原となり得ることを認め、武田<sup>3)</sup>、土屋<sup>4)</sup>等も血球感作系は多糖体が主役を演ずると述べた。これに反して若倉<sup>5)</sup>はツベルクリン(以下「ツ」と略記す)の各分劃中 Biuret 反応強陽性のものが最も抗原性が強いと論じ、守矢<sup>6)</sup>は血球凝集反応感作原溶液に就て蛋白1%以上、多糖体0.5%以上の場合に最も高い凝集価を認め、且つ両者共に感作能力を有するとしている。又根津<sup>7)</sup>は多糖体、蛋白共に感作能を有し、しかも後者に於ては哺乳動物結核菌、鳥型結核菌及びチモテー菌の鑑別が可能であると述

べている。又 Boyden<sup>8)</sup>は血球をタンニン酸で処置して初めて蛋白体が感作原となり得ると言い、矢追<sup>11)</sup>は精製蛋白 PPD には感作能なしとした。又 Hein, Sroka<sup>10)</sup>はトリプシンで血球を前処置して凝集価の上昇を認めている。長尾<sup>9)</sup>は破碎結核菌水エキスをゲラチン加墨粒子に吸着せしめて感作粒子凝集反応を行い、菌体の破碎によつて感作原物質が抽出可能であると言っている。

他方本反応の意義に関しては多数の追試者を見、矢追<sup>11)</sup>、熊谷<sup>14)</sup>、浅野<sup>15)</sup>、小路<sup>16)</sup>、古賀<sup>17)</sup>、小西池<sup>18)</sup>、山下<sup>19)</sup>等の広汎なる研究をはじめ結核以外の報告に関しては Landsteiner<sup>12)</sup>

はヴィールスに就き、Alexander<sup>13)</sup>は Tularemia に就て血球凝集反応を応用している。

私は前篇<sup>20)</sup>に於て旧「ツ」中の皮膚反応と血球凝集反応の両活性因子は全く異つた物質であることを述べた。今回は更に人型“H<sub>2</sub>”菌体を Anderson<sup>21, 22)</sup>氏法により抽出せる磷脂質と、

その脱脂菌体より得たる精製蛋白、及び Boivin<sup>23)</sup>、小西<sup>24)</sup>、安在<sup>25)</sup>等の方法により抽出せる多糖体並に菌体の加熱水浸出液を感作原として血球凝集反応を行つてその態度を検討し、二三の知見を得たのでここに報告し、御批判を仰ぐ次第である。

## 実験方法

### 1) 感作原

#### a) 磷脂質及び蛋白

Sauton 培養10週後の人型結核菌 H<sub>2</sub> 株を 100°C 1 時間加熱殺菌し、菌体を滅別乾燥したものを Anderson<sup>21, 22)</sup>の法により抽出した。即ち熱殺乾燥菌体を Soxhlet の装置により Alcohol, Ether 等量液にて 100 時間浸出、その溶液を Seitz 濾過器にて濾過→濃縮→Ether に溶解を 3 回繰返し、Ether を蒸発せしめ、再び Ether を加えて溶解し、分液漏斗に投じ同量の水を加え、毎日 30 分宛 2 日間振盪、Ether 層をとり濃縮→Ether に溶解し更に Aceton をその 20 倍量に加え、その際生じた不溶物質を室温沈澱して真空乾燥した。実験にはかくして得たる第 1 磷脂質を使用した。

他方菌体残渣に N/10 NaOH を 50 倍量加え、37°C 48 時間 (1 日数回振盪) 解卵器中にて浸出し、3,000 回 15 分遠心、その上澄をとり、Seitz 濾過器にて濾過し、氷醋酸を加えて沈澱を最大ならしめ、3,000 回 15 分遠心、その沈澱に N/30 NaOH を加えて溶解、10% 醋酸を除々に滴加して再び沈澱 (p.H. ≈ 3.8) せしめ、3,000 回 15 分遠心、その沈澱を Alcohol, Ether (4:1) にて洗滌後真空乾燥し、精製蛋白を得た。

かくして得たる菌体磷脂質及び蛋白を、前者は Alcohol、後者は N/10 NaOH の少量を加えたる生理的食塩水にて 0.1% 溶液となし、その性状を検するに第 1 表の如き成績を得た。

第 1 表 菌体磷脂質及び蛋白の性状

反 応	分 割	磷脂質	蛋 白
Biuret		(-)	(+)
Xanthoprotein		(-)	(+)
Sulfosalicylic acid		(-)	(+)
Millon		(-)	(+)
Picric acid		(-)	(+)

而して磷脂質には蛋白の混入なく、後者は明らかに蛋白体なることを確認した。

#### b) 多糖体

Boivin<sup>23)</sup>の方法に準じた。即ち熱殺乾燥菌体に 4% 三塩化醋酸を 5 倍量加え、37°C 24 時間振盪→氷室内 24 時間放置→遠心後その上澄をとり、Seitz 濾過器にて濾器、トルオールを重層して透析し、中性となりたる後湿濾紙にて濾過後 30°C 以下にて減圧濃縮し、Aceton 10 倍量を加え、室温沈澱せるものを 4% 三塩化醋酸 20ml に溶解、遠心、その上澄に Aceton 10 倍量加え、沈澱を 4% 三塩化醋酸 20ml に溶解、遠心後上澄に再び Aceton 10 倍量を加え、遠心沈澱せるものを蒸溜水に溶解、氷室に 48 時間放置後遠心、上澄には再び Aceton 10 倍量加え、沈澱物を Aceton, Ether にて各数回洗滌真空乾燥により得た。

かくして得たる菌体多糖体の性状は第 2 表の如くである。

第 2 表 菌体多糖体の諸性状

反 応	成 績
Biuret 反応	(-)
Xanthoprotein //	(-)
Sulfosalicylic acid //	(-)
Millon //	(-)
Picric acid //	(-)
Ninhydrin //	(-)
Molisch //	(+)
Seliwanoff //	(+)
Phloroglucinol //	(+)
Trommer //	(±)

表の如く蛋白呈色沈澱反応共に陰性にして、Molisch 反応強陽性、Seliwanoff 反応、Phloroglucinol は陽性、Trommer 反応は疑陽性であつた。

## c) 菌体浸出液 (P と称す)

蒸留水 1ml 中に熱殺乾燥菌体 50mg を含有する如くし、振盪後 60°C 1 時間加熱し、氷室に 48 時間放置、遠心してその上澄を用いた。

この上澄液の性状は第 3 表に示す如くである。

この浸出液は多糖体を主とし、少量の蛋白体の混入を推定させるものの如くである。

## 2) 感作血球, 被検血清, 反応術式, 成績判定法

前篇<sup>20)</sup>に述べたので省略する。

## 3) 被検者

すべて国立金沢病院の入院患者及び職員である。

第 3 表 菌体浸出液 (P) の性状

反 応	成 績
Biuret 反応	(-)
Xanthoprotein //	(-)
Sulfosalicylic acid //	(±)
Millon //	(-)
Picric acid //	(-)
Ninhydrin //	(+)
Molisch //	(+)
Seliwanoff //	(+)
Phloroglucinol //	(+)
Trommer //	(±)

## 実 験 成 績

## 1) 菌体磷脂質及び菌体蛋白をもつて感作せる血球凝集反応成績

前記方法により抽出せる菌体磷脂質の 5mg, 10mg, 20mg を夫々 Alcohol 5ml に溶解, その 1ml に 9ml の生理的食塩水を加え, 次で 1/20 量の洗滌人 O 型血球を加えて感作し, 型の

如く抗原溶液を作製し, 結核患者血清との間に血球凝集反応を行つた成績は, 第 4 表に示す如く菌体磷脂質には感作能は全くなきものと考える。又使用した磷脂質の量の決定は秋山<sup>25)</sup>の菌体磷脂質の皮膚反応成績より旧「ツ」の 10 倍に対応する如くした。

第 4 表 菌体磷脂質 (400γ/ml) をもつて感作せる血球凝集反応

被検者名	血清稀 釈倍数	2	4	8	16	32	64	対 照 (1)(2)	「ツ」感作血球 による凝集価
清	○	-	-	-	-	-	-	-	32
北		-	-	-	-	-	-	-	32
澁	○	-	-	-	-	-	-	-	64
梅	○	-	-	-	-	-	-	-	64
山	○	-	-	-	-	-	-	-	32

註. 対照 (1) 感作血球 + 生理的食塩水 (2) 血清 + 非感作血球

第 5 表 菌体蛋白 (10mg/ml) をもつて感作せる血球凝集反応

被検者名	血清稀 釈倍数	2	4	8	16	32	64	対 照 (1)(2)	「ツ」感作血球 による凝集価
拆	○	-	-	-	-	-	-	-	32
山	○	-	-	-	-	-	-	-	32
松	○	+	-	-	-	-	-	-	64
清	○	-	-	-	-	-	-	-	32
北		-	-	-	-	-	-	-	32

次に 菌体蛋白 10mg, 50mg, 100mg を生理的食塩水 10ml に少量の N/10 NaOH を加えて溶解し、血球を感作して反応を行つた。その成績は第5表に示す如く 100mg を用いた場合 1例に於て2倍陽性を見たのみで、他はすべて陰性に終つた。尙使用蛋白量は藏<sup>23)</sup>の菌体蛋白の皮膚反応成績より旧「ツ」10倍に対応する如くした。

以上の如く私の実験では精製蛋白にも血球凝集反応感作因子を認めることは出来なかつた。

2) 菌体多糖体をもつて感作せる血球凝集反応

Boivin<sup>23)</sup>の法により抽出せる精製多糖体の 10mg, 20mg, 50mg, 100mg を 10ml の生理的食塩水に溶解し、血球を加えて型の如く抗原液を作製し、結核患者血清との間に行つた血球凝集反応成績は 10mg/ml を用いて感作した場合のみ重症2例に於て弱陽性を見たに過ぎなかつた。

その他の濃度に於ける感作血球凝集反応はす

第6表 菌体多糖体 (10mg/ml) をもつて感作せる血球凝集反応

被検者名	血清稀釈倍数	2 4 8 16 32 64						対 照 (1)(2)	「ツ」感 作 血清凝集価
山 泉	○	—	—	—	—	—	—	—	32
長 浅	○	+	+	±	—	—	—	—	128
亀 浜	○	—	—	—	—	—	—	—	32
菱 拆	○	+	±	—	—	—	—	—	64
	○	—	—	—	—	—	—	—	32
	○	—	—	—	—	—	—	—	16
	○	—	—	—	—	—	—	—	32

べて陰性であつた。

私の菌体より精製せる多糖体にも強力な活性因子は認められなかつた。而して小西<sup>24)</sup>、安在<sup>25)</sup>法により製せる多糖体も略同様の成績であつた。

3) 菌体加熱浸出液 (P) による血球凝集反応成績

実験方法の項にて述べた如くして作製せる P の 1.8ml に 8.5%食塩水 0.2ml を加えて等張液となし、血球を感作して抗原を作製し、10倍旧「ツ」感作血球を対照として結核患者血清との間に血球凝集反応を行つた成績は第7表に示す如くである。

表に示す如く凝集価は「ツ」を感作原とせる

第7表 P 及び「ツ」感作血球凝集反応の比較成績

患 者 名	感作原 種 類	血 清 稀 釈 倍 数										対 照 (1)(2)
		2	4	8	16	32	64	128	256	512		
黒 〇	P	++	++	++	+	+	±	—	—	—		—
	ツ	++	++	++	++	+	+	+	±	—		—
山 〇	P	+	+	+	+	±	—	—	—	—		—
	ツ	++	+	+	+	+	±	—	—	—		—
島 〇	P	++	+	+	+	±	—	—	—	—		—
	ツ	++	++	+	+	+	—	—	—	—		—

保 ○	P	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	ツ	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
西 ○	P	++	+	+	+	±	-	-	-	-	-
	ツ	++	++	++	+	+	+	±	-	-	-
下 ○	P	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	ツ	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
山 ○	P	++	++	++	+	±	-	-	-	-	-
	ツ	++	++	++	++	+	+	±	-	-	-
田 ○	P	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
	ツ	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-
浜 ○	P	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	ツ	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
谷 ○	P	++	+	+	±	-	-	-	-	-	-
	ツ	++	++	+	+	±	-	-	-	-	-
澁 ○	P	++	+	+	+	+	±	-	-	-	-
	ツ	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-

場合と略同様な成績である。即ち精製した蛋白  
或は多糖体よりも却つて簡單なる製法による浸

出液に、より強力なる血球感作因子の存在が証  
明された。

第8表 P と旧「ツ」(OT) の  
皮膚反応比較成績

(A)

被検者名	P (1:10)	OT (1:2000)
平 ○	45×60	10×10
北 ○	50×55	15×20
山 ○	40×45	16×17

(B)

被検者名	P (1:50)	OT (1:2000)
林	40×70	12×12
宮 ○	45×46	13×15
田 ○	26×28	16×18

(C)

被検者名	P (1:100)	OT (1:2000)
拆 ○	25×30	18×20
横 ○	20×22	10×12
宮 ○	18×19	12×12

(E)

被検者名	P (1:500)	OT (1:2000)
大 ○	10×10	12×13
木 ○	16×18	20×22
西 ○	9×9	16×18

(D)

被検者名	P (1:200)	OT (1:2000)
山 ○	15×19	15×18
三 ○	16×17	16×17
小 ○	20×25	18×20
市 ○	40×42	40×40
田 ○	30×32	28×30
原 ○	17×18	19×20
野 ○	30×35	30×30
大 ○	16×17	18×20
中 ○	25×26	26×28
拆 ○	18×20	17×19

4) P と旧「ツ」をもつてする皮膚反応比較  
実験

P を生理的食塩水にて10倍, 50倍, 100倍, 200倍及び500倍に稀釈し, 標準旧「ツ」2,000倍液と皮膚反応惹起力を比較検討した. 両者の0.1ml を BCG 非接種成人に対し同時に両側前膊皮内に注射し, 48時間後に判定した. 表に示す如く P の 200倍と旧「ツ」2,000倍と一致せる如くで, 即ちP は旧「ツ」の10倍と略同等の力価を有するものの如くである. 而してこのP に前篇<sup>23)</sup>の「ツ」と同様に血球を連続完全感作し, その後のP を200倍に稀釈して皮膚反応を行つたが, 成績は血球感作前と同様にして, 前篇の旧「ツ」に於けると同様の成績を得た.

5) グリセリン—ブイオン培地とソートン培地より製せるツベルクリンをもつて感作せる血球凝集反応比較

人型菌 H<sub>2</sub> 株をグリセリン—ブイオン培地及びソートン培地に8週間培養し, 夫々より製せるツベルクリンを人O型血球に感作し, 結核患者血清との間に行つた血球凝集反応の比較成績は第9表に示す如く両者間には大差なかつた.

6) O-Aminophenol-Azo-Tuberculin (OA-Azo-T) による血球凝集反応

教室製保存の OA-Azo-T を感作原として(100γ/0.1ml) 血球凝集反応を行い, 他方皮内反応を行い, 第10, 第11表に示す如き成績を得た.

第 9 表

被検者名	感作「ツ」種類	血 清 稀 釈 倍 数								対 照 (1)(2)
		2	4	8	16	32	64	128	256	
谷 ○	グ ソ	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		+	+	+	+	±	-	-	-	-
銭 ○	グ ソ	+	+	+	+	±	-	-	-	-
		+	+	+	+	±	-	-	-	-
角	グ ソ	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	-	-	-
浜 ○	グ ソ	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	±	-	-	-	-	-
浅 ○	グ ソ	+	+	+	+	+	+	±	-	-
		+	+	+	+	+	±	-	-	-

グ……グリセリンブイオンツベルクリン

ソ……ソートン ツベルクリン

第10表 OA-Azo-T 及び OT をもつて感作せる血球凝集反応比較成績

被検者名	感 作 原	血 清 稀 釈 倍 数								対 照 (1)(2)
		2	4	8	16	32	64	128	256	
上 ○	OA-Azo-T OT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		++	++	++	+	+	±	-	-	-
眞 ○	OA-Azo-T OT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		++	+	+	+	-	-	-	-	-
北 ○	OA-Azo-T OT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		++	++	++	++	+	-	-	-	-

梅 ○	OA-Azo-T	— — — — — — — —	—
	OT	++ ++ + + + ± — —	—
山 ○	OA-Azo-T	— — — — — — — —	—
	OT	++ ++ + + + + + —	—

第11表 OA-Azo-T 及び OT  
の皮膚反応比較成績

被検者名	「ツ」 種類	OA-Azo-T	OT
		(0.18/0.1ml)	(1/2,000)0.1ml
梅 ○		20×25	19×20
西 ○		18×18	17×20
不 ○		20×20	10×11
内 ○		18×20	15×15
拆 ○		12×17	10×11
山 ○		10×11	8×10

即ち OA-Azo-T は強い皮膚反応惹起力を保有するが、血球感作能はなきものと思われる。

## 結 論

人型結核菌 “H<sub>2</sub>” 株の菌体各分割を人 O 型血球に感作せしめて結核患者血清に対し血球凝集反応を行った。その結果

1) 精製磷脂質、蛋白及び多糖体には感作能を認めなかつた。然し單に加熱による浸出成分 (P) に強力なる感作能を認めた。

2) この菌体浸出成分は多糖体を主体とし、少量の蛋白を含んだものの様に考えられる。

3) 尙 P と OT との皮膚反応惹起力を比較せるに、P は OT の  $\frac{1}{10}$  であつた。

4) OA-Azo-T には強力なる皮膚反応惹起力を有するが、感作能は認められなかつた。

## 文 献

第4篇の終りに一括する。

## Summary

Using the human O type red blood cells treated with purified bacillary body fractions such as phosphatide, protein and polysaccharide, with heat-extract, with old tuberculin and with o-aminophenol azo-tuberculin of human type tubercle bacilli “H<sub>2</sub>”, a series of experiments were carried out concerning agglutinability of the treated red cells by the sera of tuberculosis patients.

The results obtained were as follows :

1) Hemagglutination tests were positive when either the heat-extract or old tuberculin was used as the erythrocytesensitizing antigen, but negative when either the purified bacillary body fraction or o-aminophenol azo-tuberculin was used in place of the heat-extract or old tuberculin.

2) Hemagglutination tests were positive almost to the same degree when the red cells were treated either with undiluted heat-extract or with tenfold diluted old tuberculin. In passing, the skin-reactivity of heat-extract was one tenth of that of old tuberculin.

3) In spite of highest skin-reactivity of o-aminophenol azo-tuberculin, red cells treated with it were not agglutinated by the sera of tuberculosis patients.